

## Comunicação

[Communication]

### Efeito da *Mannheimia granulomatis* sobre cultivo de fibroblastos

[Effect of *Mannheimia granulomatis* on fibroblastos cultures]

S. Ladeira<sup>1</sup>, F.R. Gomes<sup>1</sup>, T. Vidor<sup>1</sup>, E.L. Portianski<sup>2</sup>, E.J. Gimeno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária - UFP

Caixa Postal 354

96010.900 – Pelotas, RS

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP – La Plata, Argentina

Recebido em 6 de junho de 2007

Aceito em 1 de fevereiro de 2008

E-mail: sladeira@via-rs.net

A *Mannheimia granulomatis* é um cocobacilo Gram negativo, que causa uma enfermidade em bovinos conhecida como lechiguana. A lechiguana é caracterizada pela formação de grandes tumores subcutâneos, conseqüentes à marcada proliferação de tecido fibroso, usualmente localizados na região da escápula.

Na enfermidade observa-se histologicamente tecido conjuntivo bastante vascularizado, com presença de fibras colágenas entrelaçadas, infiltrado por eosinófilos, plasmócitos, linfócitos e neutrófilos. A lesão primária provocada é uma linfangite eosinofílica que resulta em microabscessos eosinofílicos predominantemente formados por eosinófilos, grandes células mononucleadas não identificadas e poucos neutrófilos. Na lechiguana alguns abscessos são circundados por células epitelióides, formando pequenos granulomas com rosetas contendo bactérias em seus centros. As projeções radialmente arranjadas na periferia das rosetas são similares ao material Splendore-Hoeppli (Ladeira et al., 1996; Pereira et al., 2000; Riet-Correa et al., 2000).

Considerando que o rápido desenvolvimento da fibrose na lesão da lechiguana ainda não foi elucidado, este trabalho teve por objetivo determinar se a *M. granulomatis* é capaz de estimular a proliferação *in vitro* dos fibroblastos diretamente ou estimulando os macrófagos a produzirem citocinas e/ou enzimas que determinem esta proliferação.

Os cultivos primários de fibroblastos de embrião de galinha foram feitos segundo Mayr e Guerrero (1988). Os embriões de cinco ovos com 13 dias de incubação foram processados, sendo deles retiradas as patas, cabeças, asas e vísceras, sendo o restante triturado com auxílio de uma seringa de 20ml. O material foi lavado e mantido sob agitação, em uma solução de tripsina a 0,125% em salina tamponada (PBS), durante 40 minutos em temperatura ambiente. A tripsina foi neutralizada com 10% de soro fetal bovino (SFB) e a suspensão de células centrifugada durante 10 minutos a 1500 rotações por minuto. O sedimento foi ressuspenso em meio de Eagle (Sigma-Aldrich – St. Louis, EUA.) com 10% de SFB. Os fibroblastos foram contados e distribuídos em 12 garrafinhas de 25cm<sup>2</sup> com 10ml de meio com a concentração de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Em seis delas, foram adicionados 2ml (20%) de uma cultura de 18 horas de *M. granulomatis* em meio brain heart infusion (Acumedia – Michigan, EUA.), na escala 3 de McFarland (aproximadamente 2,3 x 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônias/ml), com pH em torno de 7,0, previamente congelada e descongelada três vezes. Os cultivos de fibroblastos foram incubados por 24 horas a 37°C e, após este período, foram trocados os meios e adicionado novamente o extrato bacteriano. Após 24 horas, as células foram tripsinizadas, coradas com o corante pós-vital, azul de Tripán (0,4%) e contadas as células vivas, não coradas em câmara de Fuchs-Rosenthal, comparando-se os tratamentos.

Para o cultivo de macrófagos utilizou-se lavado peritoneal de 10 camundongos albino suíço de 55 dias, com aproximadamente 38g, que foram sacrificados por inalação com éter e inoculados com 10ml de solução salina estéril (0,9% de NaCl) por via intraperitoneal. Após suave massagem a solução foi

recuperada e mantida em banho de gelo. As células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em 1ml de meio de RPMI<sup>1</sup> com 10% de SFB. O número de macrófagos foi ajustado para  $1 \times 10^6$  células/ml de meio de cultivo. Foram semeados 10ml da suspensão em cada uma das quatro garrafinhas e posteriormente incubados a 37°C durante 2 horas em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> (Brade et al., 1982; Weinfeld et al., 1999). A seguir as células foram lavadas e duas delas infectadas com 1ml de suspensão da bactéria em solução salina na concentração 3 da Escala McFarland, com igual volume de soro hiperimune contra a *M. granulomatis* e 10% de soro de cobaio, como fonte de complemento. Depois de 24 horas de incubação os sobrenadantes dos cultivos dos macrófagos infectados com a bactéria foram retirados para serem utilizados nos cultivos de fibroblastos. As outras duas garrafinhas foram consideradas como controle negativo, e também utilizadas no cultivo de fibroblastos. O mesmo procedimento foi feito 48 horas após.

Foram preparadas 18 garrafinhas com cultivo de fibroblastos de embrião de galinha, da mesma forma que o primeiro experimento. Seis garrafinhas foram inoculadas com 2ml de sobrenadante dos macrófagos ativado pela *M. granulomatis* e seis com sobrenadante das garrafinhas com macrófagos não infectados, e o terceiro grupo foi utilizado como controle, apenas com fibroblastos. O procedimento foi repetido após 24 horas e às 48 horas de cultivo as células foram contadas.

O estudo estatístico foi realizado por meio de análise de variância (ANOVA), e a comparação entre as médias com um controle pelo teste de Dunnett, para os dois experimentos.

A contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal (0,2mm<sup>2</sup>), foi feita separadamente para cada garrafinha de células que, após tripsinização, foram diluídas em 1:10. As médias das contagens das células, os desvios padrão e os resultados das análises estatísticas podem ser visualizados nas Tab. 1 e 2.

Tabela 1. Contagem de fibroblastos cultivados em presença de *M. granulomatis*.

Tratamento	Células x 10 <sup>6</sup> /ml
Grupo-controle	3,387±1,45
Fibroblastos cultivados com <i>M. granulomatis</i>	3,216±0,43

(P=0,9682)

Tabela 2. Contagem de fibroblastos cultivados em presença do sobrenadante da cultura de macrófagos.

Tratamento	Células x 10 <sup>6</sup> /ml
Grupo-controle	3,600±0,48a
Fibroblastos incubados com sobrenadante de macrófagos	4,504±0,97a
Fibroblastos incubados com sobrenadante de macrófagos infectados com <i>M. granulomatis</i>	5,412±0,87b

Valores seguidos por letras distintas diferem entre si (P=0,0039)

A análise estatística não acusou diferença significativa na proliferação dos fibroblastos entre o grupo controle e o grupo infectado com a bactéria (P=0,9682). Entretanto, o produto dos macrófagos ativado pela *M. granulomatis*, quando inoculado em cultivo de fibroblastos, causou um aumento significativo no número destas células (P=0,0039). O tratamento utilizando somente o sobrenadante de macrófagos não mostrou diferença quando comparado com o controle.

Levando-se em conta os resultados obtidos *in vitro* no presente trabalho, a questão seria questionar se *in vivo* estaria ocorrendo o mesmo processo.

O mecanismo da proliferação do tecido fibroso nos casos espontâneos da enfermidade, não está ainda suficientemente esclarecido; segundo Andrade et al. (2007), ocorreria um envolvimento de uma população de células tipo miofibroblastos que expressa RNAm para colágeno tipo I e isso estaria provavelmente associado ao aumento da deposição de colágeno. Assim, uma possível explicação para as extensas áreas de fibrose presentes nos casos de lechiguana seria a estimulação da síntese de colágeno por

### ***Efeito da Mannheimia granulomatis...***

parte dos fibroblastos proliferados a partir de fatores secretados por macrófagos infectados. De acordo com Andrade et al. (1997), ao usar o método de coloração pelo Picrosirius em cortes histológicos de casos espontâneos de lechiguana, observa-se uma produção progressiva e ordenada de tecido conjuntivo, como ocorre nos processos de cicatrização. A atividade celular se mostra sempre mais acentuada ao redor de coleções de células inflamatórias, sugerindo que os mediadores secretados possuem grande importância na ativação gênica da síntese da matriz extracelular.

Neste trabalho observou-se que só a presença da bactéria no cultivo de fibroblastos ou a utilização do sobrenadante das culturas de macrófagos sem a estimulação bacteriana não foram suficientes para induzir um aumento significativo no crescimento celular. A proliferação de fibroblastos foi significativa quando foram colocados em contato com produtos de macrófagos previamente estimulados com a *M. granulomatis*. Isso indica que é preciso que o macrófago seja estimulado pelas endotoxinas da bactéria e produza fatores de crescimento, tais como as interleucinas e enzimas, que provoquem a proliferação dos fibroblastos e, conseqüentemente, maior secreção de colágeno (Janeway et al., 2002; Tizard, 2002). Os resultados obtidos pelo presente trabalho, não são suficientes para esclarecer os mecanismos da proliferação celular dos tumores e serão necessários maiores estudos para elucidar o papel dos macrófagos ativados pela *M. granulomatis*.

Os resultados indicaram que a *Mannheimia granulomatis* ou suas endotoxinas não são capazes de estimular *in vitro* a proliferação de fibroblastos. Para que isso ocorra, é preciso a presença de produtos liberados por macrófagos ativados pela bactéria.

Palavras-chave: *Mannheimia granulomatis*, fibroblastos, macrófagos

### **ABSTRACT**

*Primary cultures of Mannheimia granulomatis were established in chicken embryos to assess their capacity to stimulate fibroblast proliferation. The capacity of the bacterium-activated macrophages to stimulate cytokine and enzyme proliferation was assessed in a mouse peritoneum macrophage culture. To evaluate the bacteria infection on fibroblasts and their growth within 48h in relation to the active macrophages, cultures were washed and trypsinized and the cells counted. Results showed no significant differences when the bacteria-infected fibroblasts were mixed with bacterial extract (P=0.9682). The treatment using just products of macrophages resulted similar to the negative control. Significant differences on cell proliferation were established (P=0,0039) when the products of M. granulomatis-activated macrophages were used, meaning that bacterial components were unable to promote fibroblast increase. Further research is needed to elucidate the effect of M. granulomatis on the macrophages.*

*Keywords: Mannheimia granulomatis, fibroblasts, macrophages*

### **AGRADECIMENTOS**

Aos colaboradores: Riet-Correa, F.; Halfen, D.C.; Martins, L.A.; Schuch, L.F.; Sandrini, J.C.R.; de Oliveira, E.S; De Toni, L.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDRADE, G.B.; LADEIRA, S.L.; BATTLEHNER, C.N. et al. Molecular and ultrastructural studies of the fibrotic lesions of bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis (Lechiguana). *Vet. Res. Commun.*, v.32, p.65-74, 2007.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MONTES, G.S. et al. Dating of fibrotic lesions by the Picrosirius-polarization method. An application using the lesions of Lechiguana (bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis). *Eur. J. Histochem.*, v.41, p.203-209, 1997.

- BRADE, V.; DIESELHOFF-DEN DULK, M.M.; VAN FURTH, R. Isolation and characterization of mononuclear phagocytes from the bone marrow, blood, and peritoneal cavity of the guinea-pig. *J. Path.*, v.137, p.139-147, 1982.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. O sistema imune na saúde e na doença. In:\_\_\_\_\_. *Imunobiologia*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.357-358.
- LADEIRA, S.L.; RIET-CORREA, F.; PEREIRA, D.B. et al. Role of *Pasteurella granulomatis* and *Dermatobia hominis* in the etiology of lechiguana in cattle. *An. N. Y. Acad. Sci.*, v.791, p.359-368, 1996.
- MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. (Eds). *Virologia Veterinária*. 3.ed. Porto Alegre: Sulina, 1988. 476p.
- PEREIRA, D.B.; RIET-CORREA, F.; LADEIRA, S.L. Estudos complementares da infecção por *Mannheimia granulomatis* (lechiguana) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.91-96, 2000.
- RIET-CORREA, F.; LADEIRA, S.L.; ANDRADE, G.B. et al. Lechiguana (focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis) in cattle. *Vet. Res. Commun.*, v.24, p.557-572, 2000.
- TIZARD, IR. (Ed). *Imunologia Veterinaria*. Uma Introdução. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.34
- WEINFELD, I.; BIRMAN, E.G.; PAULA, C.R. Macrophages phagocytosis of *Candida albicans*. An *in vitro* study. *Rev. Odont. Univ. São Paulo*, v.13, p.233-238, 1999.